

学校编码: 10384
学号: 22420071150812

密级_____

廈門大學

硕士学位论文

维生素的液相色谱分离-在线光化学衍生-
荧光光谱测定方法研究

Study on the Measurement of Vitamins with High
Performance Liquid Chromatography-Online
Photochemical Derivatization-Fluorimetric Detection

方芳

指导教师姓名: 弓振斌 教授

专业名称: 海洋化学

论文提交日期: 2010年 月

论文答辩时间: 2010年 月

2010年 月

A Dissertation submitted for the degree of Master of Science

**Study on the Measurement of Vitamins with HPLC-Online
Photochemical Derivatization-Fluorimetric Detection**

By

FANG Fang

Supervisor: Prof. GONG Zhenbin

College of Oceanography and Environmental Science,

Xiamen University, Xiamen

June, 2010

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要.....	I
Abstract.....	I
本文常用英文缩略词表	V
第一章 绪 论.....	1
1.1 维生素概况.....	1
1.1.1 水溶性维生素.....	1
1.1.2 脂溶性维生素.....	7
1.2 维生素分析方法概述.....	11
1.2.1 分光光度法.....	11
1.2.2 荧光光度法.....	12
1.2.3 电化学法.....	12
1.2.4 毛细管电泳.....	13
1.2.5 高效液相色谱法.....	13
1.3 研究工作的目的及内容.....	14
参考文献.....	16
第二章 水溶性维生素的高效液相色谱分离-在线光化学衍生- 荧光光谱测定方法研究	24
2.1 引言.....	24
2.2 实验部分.....	24
2.2.1 试剂与标准.....	24
2.2.2 仪器与设备.....	25
2.2.3 实验方法.....	25
2.3 结果与讨论.....	27

2.3.1 色谱分离条件的优化.....	27
2.3.2 光化学反应条件的优化.....	32
2.3.3 分析性能.....	33
2.4 小结.....	35
参考文献.....	35
第三章 脂溶性维生素的高效液相色谱分离-在线光化学衍生- 荧光光谱测定方法研究	38
3.1 引言.....	38
3.2 实验部分.....	38
3.2.1 试剂与标准.....	38
3.2.2 仪器与设备.....	39
3.2.3 实验方法.....	40
3.3 结果与讨论.....	40
3.3.1 色谱分离条件的优化.....	40
3.3.2 光化学反应条件的优化.....	44
3.3.3 分析性能.....	45
3.4 小结.....	47
参考文献.....	48
第四章 结论与展望	52
4.1 结论.....	52
4.2 研究工作展望.....	52
在学期间发表的论文及参加的科研工作	53
致 谢.....	54

CONTENTS

Abstract (in Chinese)	I
Abstract (in English)	I
English Abbreviations Table	V
Chapter I Introduction	1
1.1 Overview of Vitamins	1
1.1.1 Overview of Water-soluble Vitamins	1
1.1.2 Overview of Fat-soluble Vitamins	7
1.2 Summary of the Background Information on the Research	11
1.2.1 Spectrophotometry	11
1.2.2 Fluorometry.....	12
1.2.3 Electrochemical.....	12
1.2.4 Capillary Electrophoresis.....	13
1.2.5 High Performance Liquid Chromatography	13
1.3 Purposes and Contents of the Research	14
References	16
Chapter II Study on the Determination of Water-soluble Vitamins ..	24
2.1 Introduction	24
2.2 Experiment	24
2.2.1 Reagent and Standard	24
2.2.2 Instrument	25
2.2.3 Methods.....	25
2.3 Results and Discussions	27
2.3.1 Optimization of Chromatographic Conditions.....	27
2.3.2 Optimization of Photochemical Reaction Conditions.....	32
2.3.3 Analytical Performance.....	33

2.4 Conclusions	35
References	36
Chapter III Study on the Determination of Fat-soluble Vitamins	38
3.1 Introduction	38
3.2 Experiment	38
3.2.1 Reagent and Standard	38
3.2.2 Instrument	39
3.2.3 Methods.....	40
3.3 Results and Discussions	40
3.3.1 Optimization of Chromatographic Conditions.....	40
3.3.2 Optimization of Photochemical Reaction Conditions.....	44
3.3.3 Analytical Performance.....	45
3.4 Conclusions	47
References	48
Chapter IV Conclusions and Prospects	52
4.1 Conclusions	52
4.2 Prospects	52
Publications and Scientific Research During Study	53
Acknowledgement	54

摘要

维生素是维持人体正常生理功能所必需的一类化合物。它们种类繁多，性质各异，按照溶解性质将维生素分为水溶性维生素和脂溶性维生素两大类。维生素在体内不提供热能，但参与人体重要的生理代谢过程，对人体生长和各个器官发育有着非常重要的作用。人体每日需要的各种维生素量极少，它们一般不能在体内合成或合成量太少，不能满足机体需要，须经常由食物供给。如果长期缺乏维生素就会导致各种疾病。维生素常作为强化食品的添加因子，它广泛存在于谷类，果蔬，肉禽及蛋类等加工品中和各种维生素营养品中。维生素的测定对食品、饲料、药品、营养品等领域都有非常重要的意义。

研究论文分四章：第一章对国内外维生素测定有关的研究进行了综述。重点总结了水溶性维生素中 B_1 ， B_2 ， NiA ， NiC ， B_{12} 和脂溶性维生素中 A ， D ， E ， K 的化学分子结构、生理特征、稳定性、供给量以及食物来源等，归纳分析了水溶性维生素和脂溶性维生素的测定方法。在此基础上拟定了论文的研究目标和内容。

第二章建立了多种水溶性维生素的测定方法。通过对色谱分离条件和光化学反应条件的优化，建立了 5 种水溶性维生素的高效液相色谱分离-在线光化学衍生-荧光光谱测定的方法。维生素 B_2 在浓度为 $0.01\sim 1.0\text{mg/L}$ 、 NiA 和 NiC 在浓度为 $0.1\sim 10.0\text{mg/L}$ 、维生素 B_1 和 B_{12} 在浓度为 $0.2\sim 20.0\text{mg/L}$ 的范围内呈线性关系。方法的相对标准偏差(RSD)小于 10%。5 种水溶性维生素的检出限(LOD, 3σ) 在 $2\mu\text{g/L}(B_2)\sim 25\mu\text{g/L}(B_{12})$ 之间。

第三章建立了多种脂溶性维生素的测定方法。通过对色谱分离条件和光化学反应条件的优化，建立了 5 种脂溶性维生素的高效液相色谱分离-在线光化学衍生荧光测定的方法。维生素 K_2 ， K_3 ， E ， A 在浓度为 $0.1\sim 10.0\text{mg/L}$ 、维生素 K_1

在浓度为 0.01~1.0mg/L 的范围内呈线性关系。方法的相对标准偏差(RSD)小于 10%。5 种脂溶性维生素的检出限(LOD, 3σ)在 2 μ g/L(K_1)~24 μ g/L(A)之间。

第四章对研究工作进行了总结, 并对后续工作进行了展望。

研究工作主要贡献在于, 建立了高效液相色谱结合在线光化学衍生荧光光谱法测定多种维生素的新方法。相比于传统的紫外-可见吸收测定或化学试剂衍生荧光光谱测定等方法, 所建立的方法具有快速、准确、可靠, 检出限好, 环境友好等特点。为研究医药、食品、生物、化工、环境等领域各种维生素的测定提供了可靠的新方法。

关键词: 水溶性维生素; 脂溶性维生素; 高效液相色谱; 在线光化学衍生; 荧光光谱测定

Abstract

Vitamins are a class of organic compounds which are necessary for physiological function of the body. Depending on their solubility, vitamins are divided into two groups, water-soluble vitamins and fat-soluble vitamins. Vitamins or their precursors exist in natural foods, and no kind of natural food contains all the vitamins needed by the body. Vitamins do not provide energy for the body, and generally they are not part of the body. But they have a very important role in participation of metabolism and growth of the human body.

The human body rarely needs various vitamins each day, usually at the level of milligrams or micrograms, but they are absolutely indispensable. They are generally not synthesized in the body, or too less produced by the body even does not meet the body needs. We must always uptake them by food. If long-term lack of certain vitamins, it can lead to various diseases. Vitamins can be widely found in cereals, fruits, vegetables, meat, poultry, eggs and other products. So the detection of vitamins in food, medicine, nutrition and other fields is of significant.

This thesis contains four chapters. The first part is a summary of the background information on vitamins, including the molecular structure, physical characteristics, stability and sources. And the purposes of this study were made at the end of this part.

The second part of this work is to develop a rapid and accurate procedure to measure five water-soluble vitamins with HPLC separation, online photochemical derivatization and fluorescence detection after optimization of operating conditions. The limits of detection (LOD, 3σ) for developed method were $2\mu\text{g/L}(\text{B}_2)$ to $25\mu\text{g/L}(\text{B}_{12})$. The relative standard deviations (RSD) of five water-soluble vitamins were less than 10%.

The third part of this work is to develop a rapid and accurate procedure to measure five fat-soluble vitamins with HPLC separation, online photochemical derivatization and fluorescence detection. The limits of detection (LOD, 3σ) of developed method were $2\mu\text{g/L}(\text{K}_1)$ to $24\mu\text{g/L}(\text{A})$. The relative standard deviations of five fat-soluble vitamins were less than 10%.

Finally, it is the conclusion of this work and the prospects for further investigation of this study. Compared with the traditional ultraviolet spectrometry or fluorescence detection methods by adding chemical reagents, developed method in this study is fast, accurate, reliable, and has lower detection limits for all vitamins. This study provides an environment-friendly tool for vitamins determination in food, medicine, biology and chemical industry.

Key Words: Water-soluble vitamins; Fat-soluble vitamins; High performance liquid chromatography; Online photochemical deviratization; Fluorescence detection

本文常用英文缩略词表

缩略词	英文	中文
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱法
FLD	Fluorescence detector	荧光检测器
VB ₁	Thiamine hydrochloride	硫胺素, 维生素 B ₁
VB ₂	Riboflavin	核黄素, 维生素 B ₂
NiA	Nicotinic acid	烟酸
NIC	Nicotinamide	烟酰胺
VB ₁₂	Cyanocobalamin	钴胺素, 维生素 B ₁₂
VA	Retinol	维生素 A
VE	Tocopherols	生育酚, 维生素 E
VK	Phylloquinone, Menaquinone, Menadione	维生素 K ₁ , K ₂ , K ₃
LOD	Limit of detection	检出限
LOQ	Limit of quantification	定量限
r	Linear correlation coefficient	线性相关系数
RSD	Relative standard deviation	相对标准偏差

第一章 绪论

1.1 维生素概况

维生素是人体生长和发育不可或缺的重要营养要素之一，是人体新陈代谢过程中必不可少的有机化合物。它们与蛋白质，氨基酸等其他营养物质一样，是一个庞大的体系，包含的种类繁多。按照溶解性来分，维生素可以分为水溶性的维生素和脂溶性的维生素。

人体犹如一座极为复杂的化工厂，不断地进行着各种生化反应。其反应与酶的催化作用有密切关系。酶要产生活性，必须有辅酶参加。已知许多维生素是酶的辅酶或者是辅酶的组成分子。因此，维生素是维持和调节机体正常代谢的重要物质。最好的维生素是以“生物活性物质”的形式，存在于人体组织中^[1]。

食物中维生素的含量较少，人体的需要量也不多，但却是绝不可少的物质。膳食中如缺乏维生素，就会引起人体代谢紊乱，以致发生维生素缺乏症。如缺乏维生素 A 会出现夜盲症，干眼病和皮肤干燥，缺乏维生素 D 可患佝偻病，缺乏维生素 B₁ 可得脚气病，缺乏维生素 B₂ 可患唇炎，口角炎，舌炎和阴囊炎，缺乏维生素 B₁₂ 可患恶性贫血，缺乏维生素 C 可患坏血病。

本研究工作涉及以下维生素的分离及测定方法：水溶性维生素 B₁，B₂，B₁₂，烟酸，烟酰胺和脂溶性维生素 K₁，K₂，K₃，A，E。各种维生素的化学结构式见表 1-1 和表 1-2。

1.1.1 水溶性维生素

水溶性维生素包括 B 族维生素 B₁、B₂、B₆、B₁₂ 等以及抗坏血酸维生素 C，其中 B 族维生素是辅酶的重要组成部分。水溶性维生素的特点是溶于水，不溶于脂肪，容易从尿中排出体外，且排出效率高，一般不会产生蓄积和毒害作用。

1.1.1.1 维生素 B₁

维生素 B₁ 也称硫胺素(thiamine hydrochloride)，由被取代的嘧啶和噻唑环通过亚甲基相连构成。它广泛分布于动植物界，且以多种形式存在于食品中，包括游离的硫胺素，焦磷酸硫胺素以及它们与各自的脱辅基酶蛋白的结合物等。由于

硫胺素含有一个四价氮原子，故显强碱性，在食品通常遇到的酸性环境中完全解离。其嘧啶环上的氨基也可电离。噻唑环上的氮可与脱辅基酶蛋白结合，并发挥辅酶的作用。

硫胺素属于最不稳定的维生素之一，其稳定性受温度、pH、离子强度及缓冲系统等影响。其中受温度影响显著，温度高，破坏率高。在 pH 5.5~7.0 溶液中加热时，易破坏，但在巴氏消毒的乳中稳定性尚好。在低 pH 值水果饮料中很稳定。硫胺素在干燥产品中的稳定性好^[6]。

硫胺素普遍存在于动植物食品中，谷类、豆类及肉类中含量较多，籽粒的胚和酵母是其良好来源。每 100g 中，谷类硫胺素含量约 0.20mg，豆类 0.5~0.9mg。动物性食品中以肝、肾、脑含量较高。干酵母的含量可高达 6~7mg。

1.1.1.2 维生素 B₂

维生素 B₂ 也称核黄素(riboflavin)，是带有核醇侧链的异咯嗪衍生物，也可看作核醇与 6,7-二甲基异咯嗪的缩合物。在生物体内主要以磷酸酯的形式存在于两种辅酶中，即黄素单核苷酸和黄素腺嘌呤二核苷酸。与核黄素结合的酶称为黄酶或黄素蛋白，该蛋白参与氧化还原过程，在生物氧化或组织呼吸中起递氢作用。核黄素呈黄色，加氢后的还原型无色^[10]。

核黄素由小肠吸收，经血液供机体使用，并可少量贮存于肝、脾、肾和心肌，多余部分随尿排出。摄取普通膳食时，人的日排出量约 0.25~0.80mg，其中一部分为游离核黄素，一部分为磷酸核黄素。由于人体的贮存量少，故需每天从食物补充。在临床医学上，维生素 B₂ 长期用作口角炎、舌炎、结膜炎、阴囊炎、脂溢性皮炎等的辅助治疗。近年来在动物实验中观察到，维生素 B₂ 对急性心肌梗死动物模型有显著的抗血小板聚集和保护缺血心肌的作用。

核黄素在酸性或中性 pH 溶液中对热稳定，即使 120℃ 加热 6h 也仅有少量破坏，且不受空气中氧的影响，但在碱性溶液中易受热分解。核黄素对光敏感，在任何酸碱性溶液中都易受可见光，特别是紫外线破坏。在碱性溶液中辐射可引起核醇的光裂解，产生光黄素，在酸性或中性溶液中辐射可产生蓝色的荧光物质光色素及不同的光黄素。核黄素在大多数食品加工条件下都很稳定。在蔬菜罐头中，是水溶性维生素中相当稳定的一种^[15]。

核黄素广泛存在于各类食品中，动物性食品比植物性食品含量高，其中以内脏的含量更高些。每 100g 中，肝的含量可达 2mg，肾的含量约 1mg，禽蛋的含量约 0.3mg。植物性食品以豆类的含量较高，约为 0.1~0.3mg，绿叶蔬菜含量约 0.1mg，一般蔬菜和谷类含量较少，多在 0.1mg 以下。

1.1.1.3 烟酸和烟酰胺

烟酸曾被称为尼克酸(nicotinic acid, NiA)，可看作吡啶环的第五位碳原子的一个氢被羧基取代。在体内烟酸的羧基易变为酰胺基，此即烟酰胺(nicotinamide, NIC)。烟酸和烟酰胺具有相同生物活性。在体内该维生素以烟酰胺的形式参与机体代谢，是脱氢酶辅酶的组成成分。

烟酸由小肠吸收，在体内转变为辅酶，分布于全身；但不能贮存，过量部分绝大多数代谢后随尿排出，尿中仅含少量未代谢的烟酸或烟酰胺。烟酰胺参与构成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。这两种辅酶是组织中生物氧化体系的重要递氢体，参与葡萄糖酵解、脂代谢、丙酮酸代谢、戊糖合成及高能磷酸键的形成等。机体缺乏烟酸，出现糙皮病^[4]。

烟酸是最稳定的维生素之一。它耐热，120℃加热 20min 几乎不受破坏，对光、氧、酸、碱也很稳定。由于其水溶性质，在食品加工时可有一定量流失，这种损失与其他水溶性维生素平行。在乳品加工时，几乎无烟酸损失。

烟酸和烟酰胺广泛存在于动植物体内，但一般含量不高。含量最多的是蘑菇和酵母，每 100g 含量可达数十毫克。花生含量约 10mg，豆类和全谷每 100g 约几毫克。动物性食品中以肝脏含量最高，为 10mg 左右。

1.1.1.4 维生素 B₁₂

维生素 B₁₂ 是化学结构最复杂的维生素，因分子中含钴原子而呈红色。它是目前所知唯一一种含有金属元素的维生素。其所含的钴也只有以维生素 B₁₂ 的形式，才能发挥其必需微量元素的作用。维生素 B₁₂ 有两个特性成分，一个在其核苷酸样结构中，另一个是其中间的环状结构为类似卟啉的咕啉环系统。与咕啉环的四个氮原子配位的是一个钴原子，因此维生素 B₁₂ 也称钴胺素(cyanocobalamin)。

维生素 B₁₂ 的吸收必需正常的胃液分泌。胃液中的两个成分影响维生素 B₁₂ 的吸收，一个是胃酸，可帮助将与蛋白质结合的维生素 B₁₂ 分解游离出来，一个是由胃贲门和胃底粘膜分泌的一种糖蛋白，称为内因子。维生素 B₁₂ 只有与内因

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库